

# 缺氮胁迫下生长素对普通小球藻生长及油脂积累的影响

耿媛媛<sup>1</sup>, 张贤明<sup>1</sup>, 聂煜东<sup>1,2,3</sup>, 姜岩<sup>1</sup>, 杨哲涵<sup>1</sup>, 李金<sup>1</sup>, 颜海燕<sup>1</sup>, 申粤<sup>1</sup>

(1. 重庆工商大学 废油资源化技术与装备教育部工程研究中心, 重庆 400067; 2. 中国科学院 生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085; 3. 重庆理工大学 化学化工学院, 重庆 400054)

**摘要:**以普通小球藻为研究对象,在氮缺乏条件下分别添加天然生长素吲哚乙酸(IAA)、人工合生长素萘乙酸(NAA)及2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),研究了不同生长素添加量下普通小球藻的生长特征、油脂积累及藻油脂肪酸组成。结果表明:最佳的生长素添加量分别为IAA 1.0 mg/L、NAA 2.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L;在IAA、NAA、2,4-D最佳添加量下,普通小球藻最高生物量分别为158、159、164 mg/L,是单一缺氮(ND)培养下生物量的1.27、1.28、1.32倍,与整个培养周期前8 d正常培养(BG11)下的微藻生物量相比无显著性差异,生长素有效抵消了缺氮胁迫对生物量的负面影响;在IAA、NAA、2,4-D最佳添加量下,普通小球藻最大总脂含量分别是BG11培养条件下的1.72、1.64、1.74倍,最大总脂产量分别为61.38、58.83、64.22 mg/L,是BG11组的1.49、1.43、1.56倍,而ND组最大总脂产量低于BG11组;在最佳生长素添加量下,普通小球藻细胞内最大甘油三酯含量分别为27.97%、25.66%、33.21%,最大甘油三酯产量分别为44.19、40.80、54.46 mg/L,均明显高于BG11组;C16~C20脂肪酸成分分别占总脂肪酸的71.99%、73.75%、84.81%。研究表明,缺氮胁迫下3种生长素对普通小球藻生长及油脂合成具有明显促进作用,其中2,4-D效果最佳。

**关键词:**普通小球藻;缺氮胁迫;生长素;生长;油脂积累

中图分类号:Q945;TK6

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)01-0095-06

## Effects of auxin on growth and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* under nitrogen stress

GENG Yuanyuan<sup>1</sup>, ZHANG Xianming<sup>1</sup>, NIE Yudong<sup>1,2,3</sup>, JIANG Yan<sup>1</sup>,  
YANG Zhehan<sup>1</sup>, LI Jin<sup>1</sup>, YAN Haiyan<sup>1</sup>, SHEN Yue<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center for Waste Oil Recovery Technology and Equipment of Ministry of Education, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

**Abstract:** Natural auxin indole acetic acid (IAA), synthetic auxin naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) were added into a nitrogen deficient culture medium to

收稿日期:2021-01-24;修回日期:2021-09-02

基金项目:国家自然科学基金项目(21804014);重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0734);重庆工商大学科学研究项目(1752012)

作者简介:耿媛媛(1996),女,硕士研究生,研究方向为微藻生物质能源(E-mail)Gyuan@163.com。

通信作者:聂煜东,助理研究员(E-mail)nieyudong@126.com。

study the effects of different auxin dosage on growth characteristics, lipid accumulation and algal oil fatty acid composition of *Chlorella vulgaris*. The results showed that the optimal dosages of auxins were IAA 1.0 mg/L, NAA 2.5 mg/L and 2,4-D 1.0 mg/L. Under the optimal dosage of auxins, the highest biomasses of *Chlorella vulgaris* were 158, 159 mg/L and 164 mg/L

respectively, which were 1.27, 1.28 times and 1.32 times of the deficiency nitrogen (ND) cultivation, and there was no significant difference in the biomass under normal culture (BG11) for 8 d in the whole cultural period. Auxin effectively offsetted the negative effect of nitrogen stress on biomass. The maximum total lipid content of *Chlorella vulgaris* with 1.0 mg/L IAA, 2.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L 2,4-D groups were 1.72, 1.64 times and 1.74 times of that in BG11 group, respectively. The maximum total lipid yields were 61.38, 58.83, 64.22 mg/L, respectively, which were 1.49, 1.43, 1.56 times of those in BG11 group. The maximum triglyceride contents were 27.97%, 25.66% and 33.21%, and the maximum triglyceride yields were 44.19, 40.80, 54.46 mg/L, respectively, which were significantly higher than those in BG11 group. The proportion of C16-C20 fatty acids in total fatty acids were 71.99%, 73.75% and 84.81% respectively. The research showed that the three auxins had a significant positive effect in algal growth and lipid synthesis of *Chlorella vulgaris*, and the 2,4-D was the best.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*; nitrogen stress; auxin; growth; lipid accumulation

国际局势的复杂多变对能源供给安全造成了潜在威胁,这推动了我国对能源多元化的需求,生物质能源作为能源多元化的重要一环备受期待。生物柴油是一种常见生物质能源,主要由生物油脂转化而来,而产油微藻具有易培养、生长快、耐受性强、富含油脂等优势,被认为是生物柴油生产原料的理想来源<sup>[1-2]</sup>。藻细胞在高光照强度、高盐、营养缺乏等不利环境下会以积累油脂的方式储存大量能量<sup>[3]</sup>,其中缺氮胁迫被认为是增加细胞含油率最有效的方法之一<sup>[4]</sup>。然而,在氮缺乏的条件下微藻生物量也会降低,从而影响了微藻油脂的产量<sup>[5]</sup>。因此,有必要寻找一种既能够提高微藻细胞含油率又能维持甚至增加微藻生物量的方法。

生长素是植物在生长代谢过程中产生的一类小分子物质,在细胞分裂、生长及分化等方面调控植物生长发育,因此在植物细胞和组织培养中被广泛应用<sup>[6]</sup>。近年来,生长素已被证实对微藻的生长和代谢产物合成有明显的刺激作用。杨凯等<sup>[7]</sup>研究表明,吲哚乙酸(IAA)对杜氏盐藻生长和脂肪酸合成具有促进作用;Liu等<sup>[8]</sup>研究表明,生长素萘乙酸(NAA)对普通小球藻生长和油脂合成具有明显的促进作用,2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)也具有同样的效果<sup>[9]</sup>。因此,通过生长素的调节补偿缺氮导致的生物量下降具有一定可行性。

当前,在常规培养条件下添加生长素以提高微藻油脂产量已成为研究热点之一,但在完全缺氮条件下生长素对微藻生物量和油脂积累的影响研究仍有待完善。本研究以普通小球藻为研究对象,在缺氮条件下添加不同种类的生长素 IAA、人工合成生长素 NAA 和 2,4-D,研究 3 种生长素对微藻生长、油脂积累以及油脂脂肪酸组成的影响,进而确

定普通小球藻产油最适生长素及环境条件,为藻源生物柴油规模化应用提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 藻种与培养基

普通小球藻(*Chlorella vulgaris*),中国科学院水生生物研究所淡水藻种库;正常培养基(BG11);完全缺氮培养基(ND,BG11中以等量 NaCl 代替 NaNO<sub>3</sub>)。

#### 1.1.2 主要试剂

吲哚乙酸(IAA);萘乙酸(NAA);2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D);氯仿、甲醇、氢氧化钾、二甲基亚砜(DMSO),国药集团化学试剂公司;尼罗红染料,阿拉丁试剂公司;37种脂肪酸甲酯标准溶液,Anpel公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

MGC-450BP 恒温光照培养箱,DR6000 紫外可见分光光度计,SQP 电子天平,FiveEasy Plus pH 计,LDZX-30KBS 立式高压蒸汽灭菌锅,血球计数板,BX51 荧光显微镜,F-7100 荧光分光光度计,SCIENTZ-10N 真空冷冻干燥机,TD-24K 离心机,DK-S24 电热恒温水浴锅,DHG-9070A 电热鼓风干燥箱,TOC-LCPH 总有机碳分析仪,GC1960 气相色谱仪。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 藻种培养

采用 BG11 培养基对普通小球藻进行种子扩大培养,培养条件为:培养温度(25±1)℃、光照强度 4 500 lx、光照周期光暗比为 12 h/12 h。待微藻生长至对数生长末期,以 6 000 r/min 离心 10 min,将藻细胞重悬于完全缺氮培养基。500 mL 培养液以 1×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>的细胞接种密度分装于 1 000 mL 的无

菌三角烧瓶中,加入3种生长素,调整其终质量浓度梯度分别为0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mg/L,每一质量浓度设置3个平行,常温培养14 d。所有培养液的培养条件与种子液培养条件一致,以不添加生长素的完全缺氮培养基(ND)和正常培养基(BG11)作为对照组。

### 1.2.2 藻细胞密度及生物量测定

采用血球计数板方法对普通小球藻生长过程藻细胞进行计数,以此作为藻细胞密度;采用烘干称重法对小球藻生物量进行测定,具体为:每隔2 d取一定体积的藻液( $V$ )经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜(烘干滤膜质量 $m_1$ )抽滤,洗涤,于 $60\ ^\circ\text{C}$ 烘干至恒重,冷却后称重(干藻与滤膜质量 $m_2$ )。生物量( $D_{\text{CW}}$ )按式(1)计算。

$$D_{\text{CW}} = (m_2 - m_1) / V \quad (1)$$

### 1.2.3 总脂含量及甘油三酯含量的测定

采用Bligh-Dyer法<sup>[10]</sup>测定总脂含量。取25 mg冻干藻粉(质量记为 $m$ )于10 mL离心管中,加入4 mL氯仿-甲醇溶液(体积比2:1),旋涡混匀2 min后超声(40 kHz,200 W)处理20 min,离心,收集有机相,重复提取3次,合并有机相至预烘干称重的称量瓶( $m_1$ )中,待有机溶剂完全挥发后,于 $60\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重( $m_2$ ),得到小球藻总脂。藻细胞总脂含量( $Y_1$ )按式(2)计算,总脂产量( $Y_2$ )按式(3)计算。

$$Y_1 = (m_2 - m_1) / m \times 100\% \quad (2)$$

$$Y_2 = D_{\text{CW}} \times Y_1 \quad (3)$$

采用尼罗红染色-荧光分光光度计法<sup>[11]</sup>对藻细胞内甘油三酯进行测定,以三油酸甘油酯为标准品,采用外标法得到细胞内甘油三酯含量( $Y_3$ )与相

对荧光强度的标准曲线方程,见式(4)。甘油三酯产量( $Y_4$ )按式(5)计算,其他脂质含量( $Y_5$ )按式(6)计算。

$$Y_3 = 0.1186 \times A_{482} + 0.0082 (R^2 = 0.9954) \quad (4)$$

$$Y_4 = Y_3 \times D_{\text{CW}} \quad (5)$$

$$Y_5 = Y_1 - Y_3 \quad (6)$$

### 1.2.4 脂肪酸组成测定

脂肪酸甲酯化:取1.2.3获得的小球藻总脂,加入2 mL 4%氢氧化钾-甲醇溶液,于 $40\ ^\circ\text{C}$ 水浴60 min,然后加入1 mL正己烷萃取,待混合溶液静置分层后,取200  $\mu\text{L}$ 上清液至气相色谱专用玻璃瓶中密封。采用气相色谱分析样品的脂肪酸组成。

气相色谱条件:DB-FAST毛细管柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 cm);升温程序为初始温度 $80\ ^\circ\text{C}$ ,以 $40\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温到 $165\ ^\circ\text{C}$ ,保持1 min,再以 $4\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温到 $230\ ^\circ\text{C}$ ,保持10 min;载气为氮气,进样口温度 $250\ ^\circ\text{C}$ ,FID检测器温度 $260\ ^\circ\text{C}$ ;进样量 $1\ \mu\text{L}$ 。

通过比较样品中未知色谱峰与37种脂肪酸甲酯标准溶液的保留时间对样品中脂肪酸进行定性,采用面积归一化法定量。

### 1.2.5 总氮含量测定

参照《水和废水监测分析方法(第四版)》<sup>[12]</sup>检测微藻培养后培养基中的总氮(TN)含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺氮胁迫下生长素对微藻生长的影响

在缺氮条件下分别添加0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mg/L的IAA、NAA和2,4-D,考察其对普通小球藻生长的影响,结果如图1所示。

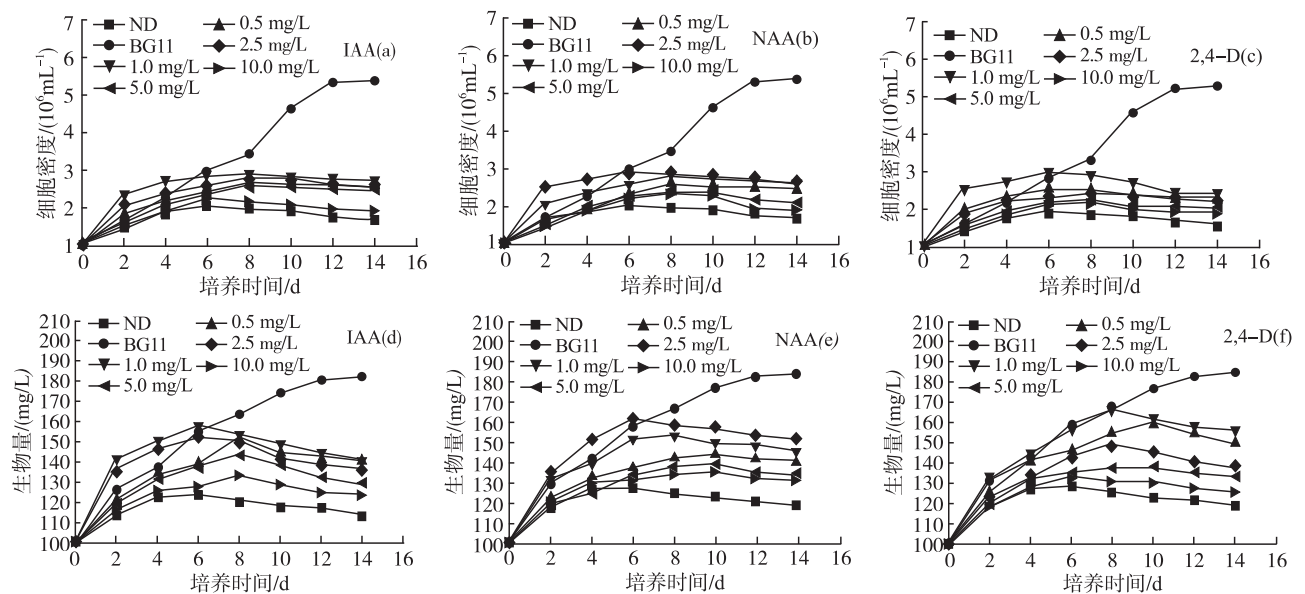


图1 不同生长素对普通小球藻细胞密度及生物量的影响

从图1可以看出,所有缺氮组中普通小球藻在培养前期生长均呈快速上升趋势,后期生物量和细

胞密度均略微下降,而BG11组普通小球藻生物量和细胞密度前期虽增长速率慢于部分缺氮组,但培养12 d内均保持上升趋势。1.0 mg/L IAA组培养8 d获得最大细胞密度,为 $2.94 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,培养6 d获得最大生物量,为158 mg/L。2.5 mg/L NAA组培养6 d获得最大细胞密度和生物量,分别为 $2.85 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 和159 mg/L。1.0 mg/L 2,4-D组培养6 d获得最大细胞密度,为 $3.05 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,培养8 d获得最大生物量,为164 mg/L。2,4-D对普通小球藻生长促进效果略优于其他两类生长素。与各实验组相比,ND组由于缺乏外界刺激诱导,培养4 d时胞内氮源耗尽,生长陷入停滞。综上,生长素最佳添加量分别为IAA 1.0 mg/L,NAA 2.5 mg/L,2,4-D 1.0 mg/L。

分别在1.0 mg/L IAA、2.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 2,4-D 3种生长素作用下,最大细胞密度相对于ND组(最大细胞密度 $1.98 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ )提升至1.48、1.44、1.54倍,而最大生物量相对于ND组(最大生物量124 mg/L)分别提升至1.27、1.28、1.32倍,与整个培养周期前8 d BG11组相比,生物量无显著性差异,这说明在缺氮条件下,生长素更多的是促进细胞的分裂与增殖,细胞个体的生长由于氮素的缺乏而受到了一定抑制,同时生长素有效抵消了缺氮胁迫对生物量的负面影响。

图2为BG11、ND与最佳外源生长素添加量下ND中总氮含量的变化。

由图2可知:缺氮条件下细胞初始破裂情况较

为严重,大量胞内氮素溢出,后随细胞的生长又逐渐被吸收;NAA组由于添加量较高,也对藻细胞有一定胁迫作用,而在低添加量的IAA和2,4-D刺激下,缺氮藻细胞迅速地适应环境,因此由于细胞破裂而释放的氮素较少。实际上,生长素是藻细胞的一种化学信号分子,其通过调节有丝分裂中涉及的信号通路来刺激细胞周期进程,从而促进细胞生长<sup>[13-14]</sup>。此外,图1结果表明高浓度生长素对普通小球藻细胞生长促进作用明显低于低浓度生长素,该现象与生长素对高等植物的影响一致,即低浓度促进,高浓度抑制。总而言之,在氮限制条件下添加生长素能有效地促进普通小球藻细胞的增殖,一定程度上抵消缺氮对小球藻生长的负面影响;这同时表明生长素能够诱导普通小球藻细胞通过对胞内源性氮的利用来维持其生长。

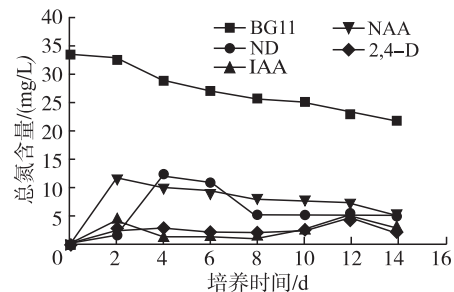


图2 BG11、ND与最佳生长素添加量下ND中总氮含量变化趋势

2.2 缺氮胁迫下生长素对微藻油脂合成的影响 (见图3)

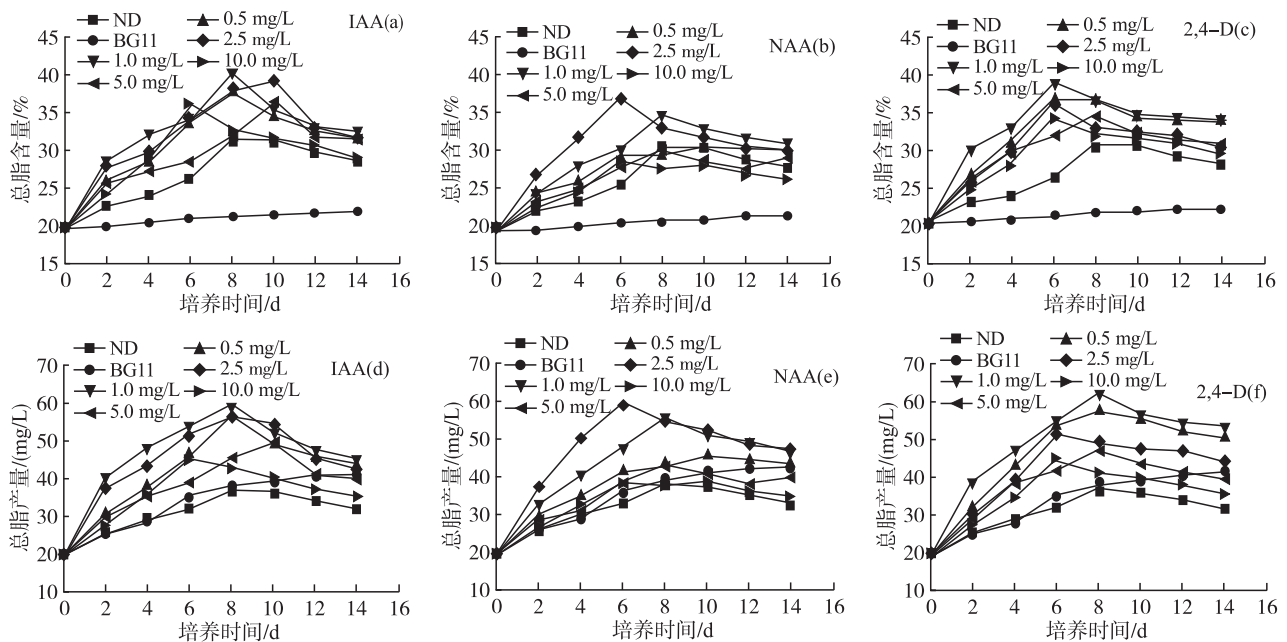


图3 不同生长素对普通小球藻总脂含量和总脂产量的影响

由图3可知,在缺氮条件下添加生长素IAA、NAA、2,4-D整体均可以显著提高微藻总脂含

量,生长素IAA、NAA和2,4-D添加量分别为1.0、2.5、1.0 mg/L时,对微藻油脂合成的促进效果最



好,最大总脂含量分别为 38.85%、37.00% 和 39.16%,而 ND 组最大总脂含量为 30.95%。相对于 BG11 组最大总脂含量 22.55% 而言,ND 组和 IAA(1.0 mg/L)、NAA(2.5 mg/L)、2,4-D(1.0 mg/L) 组最大总脂含量分别是 BG11 组的 1.37、1.72、1.64、1.74 倍。1.0 mg/L IAA、2.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L 2,4-D 组微藻最大总脂产量分别为 61.38、58.83、64.22 mg/L,是 BG11 组最大总脂产量(41.27 mg/L)的 1.49、1.43、1.56 倍,而 ND 组最大总脂产量为 38.38 mg/L,较 BG11 组的低,这是

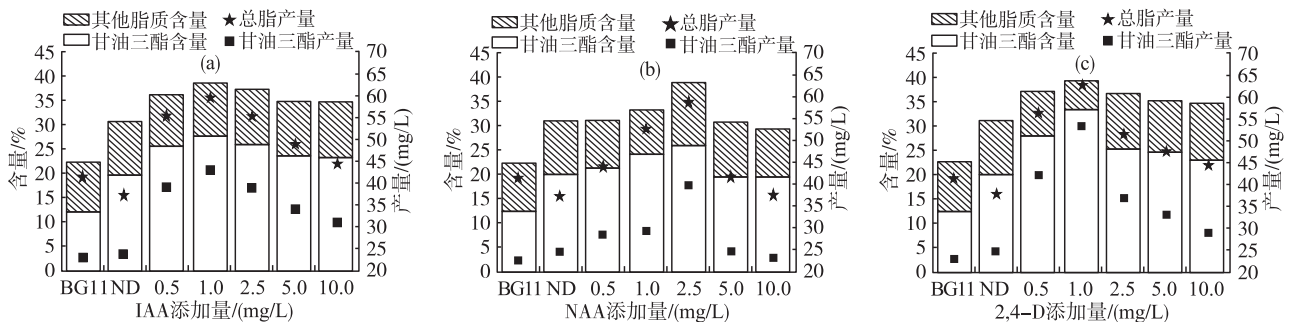


图4 不同生长素对普通小球藻甘油三酯含量、其他脂质含量、甘油三酯产量与总脂产量的影响

由图4可知,氮限制培养条件下甘油三酯含量相对于正常培养有显著提升,其中 1.0 mg/L IAA、2.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 2,4-D 组分别获得最大甘油三酯含量,相对于 ND 组的最大甘油三酯含量 19.88% 而言,分别提高至 27.97%、25.66%、33.21%,且分别是 BG11 组最大甘油三酯含量(12.31%)的 2.27、2.08、2.70 倍。说明生长素促进了微藻油脂的合成。由于生物量、总脂含量、甘油三酯含量随生长素添加量的变化趋势几乎一致,因此生长素在添加量 IAA 1.0 mg/L、NAA 2.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L 时获得最大甘油三酯产量,分别为 44.19、40.80、54.46 mg/L。

实验表明,生长素在合适的添加量下可同步促进微藻生长和油脂合成。生长素进入细胞后首先会与受体相结合,而后通过复杂的生理生化反应诱导特定基因加速表达,从而改变藻细胞的相关代谢<sup>[9]</sup>。生长素同步提高藻细胞生物量及总脂含量的原因可能是由于生长素可以提高微藻光合作用过程中的固碳关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶和油脂合成关键酶乙酰辅酶A羧化酶的活性,进而增强微藻光合作用,促进微藻生长和油脂积累<sup>[14]</sup>。还有证据表明其他油脂合成相关酶的表达也受到了生长素的影响,如绿藻属 NC-M5 中添加 IAA 和细胞分裂素促进了甘油三酯合成的关键酶甘油-3-磷酸酰基转移酶和甘油二酯酰基转移酶的基因表达<sup>[16]</sup>。此外,由于生长素在氮胁迫条件下能诱导超

由于缺氮条件下微藻生长受到极大限制,导致其虽然单个细胞总脂含量高,但总脂产量低。因此,在产油微藻缺氮培养时添加生长素刺激微藻的生长是十分必要的。

微藻油脂主要以结构脂如磷脂、糖脂以及储存脂如甘油三酯的形式存在,其中甘油三酯可以通过酯交换反应制备性能良好的生物柴油<sup>[15]</sup>。因此,油脂的成分对于生物柴油的品质至关重要。不同培养条件下普通小球藻细胞内甘油三酯含量、其他脂质含量、甘油三酯产量与总脂产量如图4所示。

氧化物歧化酶和过氧化氢酶等抗氧化酶的活性表达,猝灭了氮胁迫下产生的过多活性氧,从而减轻了缺氮造成的细胞氧化损伤<sup>[17]</sup>,这也减缓了部分氮限制造成的生长抑制。

### 2.3 生长素对普通小球藻油脂脂肪酸组成的影响

脂肪酸是组成微藻油脂的关键成分,其碳链长度、饱和度等与生物柴油的品质直接相关,因此本研究进一步对普通小球藻油脂的脂肪酸组成进行了分析,结果如表1所示。

表1 不同培养条件下普通小球藻油脂脂肪酸组成及含量

脂肪酸	含量/%				
	BG11	ND	1.0 mg/L IAA	2.5 mg/L NAA	1.0 mg/L 2,4-D
C16:0	12.16	10.42	14.94	13.64	16.13
C16:1	1.87	1.49	1.08	0.75	0.62
C18:0	5.84	7.58	9.43	7.81	5.39
C18:1	4.93	7.96	7.66	6.54	5.29
C18:2	14.53	19.29	20.08	19.85	28.21
C18:3	6.68	6.81	6.92	11.91	13.24
C20:0	8.58	10.68	11.88	13.25	15.93
总计	54.59	64.23	71.99	73.75	84.81

由表1可知,在 BG11 培养条件下 C16~C20 为代表的柴油优质成分仅占总脂肪酸的 54.59%,在氮限制培养条件下提高到 64.23%,而添加生长素 IAA、NAA、2,4-D 后进一步增加到 71.99%、73.75%、84.81%。这可能是由于生长素诱导甘油三酯的前体物单半乳糖二酰基甘油发生水解,进而

提高了 C16 和 C18 脂肪酸含量<sup>[18]</sup>。因此,生长素不仅促进了微藻总脂含量,而且还促进了生物柴油优质成分来源 C16、C18 脂肪酸的含量,且其中 2,4-D 的作用效果最佳。

### 3 结 论

以最常见的产油微藻普通小球藻为模板藻种,研究在氮限制条件下通过添加 IAA、NAA、2,4-D 3 种生长素对普通小球藻生长和油脂积累的影响。结果表明:3 种生长素的最佳添加量分别为 IAA 1.0 mg/L、NAA 2.5 mg/L、2,4-D 1.0 mg/L;在 IAA、NAA、2,4-D 最佳添加量下,小球藻最高生物量分别为 158、159、164 mg/L,是单一缺氮培养(ND)下生物量的 1.27、1.28、1.32 倍,与整个培养周期前 8 d 正常培养(BG11)下的微藻生物量相比无显著性差异,生长素有效抵消了缺氮胁迫对生物量的负影响。在 IAA、NAA、2,4-D 最佳添加量与 ND 培养条件下,普通小球藻最大总脂含量分别是 BG11 培养条件下的 1.72、1.64、1.74、1.37 倍;最大总脂产量分别是 BG11 组的 1.49、1.43、1.56、0.93 倍,胞内最大甘油三酯含量分别为 27.97%、25.66%、33.21%、19.88%,最大甘油三酯产量分别为 44.19、40.80、54.46、24.65 mg/L,C16~C20 脂肪酸成分分别占总脂肪酸的 71.99%、73.75%、84.81%、64.23%。3 种生长素的作用效果依次是 2,4-D、IAA、NAA。

### 参考文献:

- [1] 方正,吕德义. 微藻制备生物柴油的研究进展[J]. 现代化工, 2017,37(9):57-61.
- [2] RIZWAN M, MUJTABA G, LEE K. Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*[J]. Biotechnol Bioproc E, 2017, 22(1): 68-75.
- [3] SAJJADI B, CHEN W Y, RAMAN A A A, et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: a comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition[J]. Renew Sust Energ Rev, 2018, 97: 200-232.
- [4] JIA J, HAN D, HENRI G G, et al. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions[J]. Algal Res, 2015, 7: 66-77.
- [5] YU Z, PEI H, JIANG L, et al. Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae[J]. Bioresour Technol, 2018, 247: 904-914.
- [6] VOSS U, BISHOPP A, FARCOT E, et al. Modelling hormonal response and development[J]. Trends Plant Sci, 2014, 19(5): 311-319.
- [7] 杨凯, 史全良. 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 生长及脂肪酸含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2009,18(2): 80-83.
- [8] LIU J, QIU W, SONG Y. Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*[J]. Algal Res, 2016, 18: 273-280.
- [9] 郝宗娣, 刘平怀, 时杰, 等. 不同生长素对原始小球藻生长及总脂含量的影响[J]. 广东农业科学, 2012, 39(8): 104-107.
- [10] GREENSPAN P, MAYER E P, FOWLER S D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets[J]. J Cell Biol, 1985, 100(3): 965-973.
- [11] CHEN W, ZHANG C, SONG L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae[J]. J Microbiol Meth, 2009, 77(1): 41-47.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [13] CHU J L, LI Y, CUI Y L, et al. The influences of phytohormones on triacylglycerol accumulation in an oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. J Appl Phycol, 2019, 31(2): 1009-1019.
- [14] BABU A G, WU X, KABRA A N, et al. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation[J]. Algal Res, 2017, 23: 178-185.
- [15] ZHU L D, LI Z H, HILTUNEN E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock[J]. Biomed Res Int, 2016(3): 1216-1226.
- [16] GULDHE A, RENUKA N, SINGH P, et al. Effect of phytohormones from different classes on gene expression of *Chlorella sorokiniana* under nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production [J/OL]. Algal Res, 2019, 40: 101518 [2021-01-20]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101518>.
- [17] MANDAL M K, CHANU N K, CHAURASIA N. Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase & diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: a potential approach for biodiesel production [J/OL]. Bioresour Technol, 2020, 297: 122439 [2021-01-20]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122439>.
- [18] LI X, ERIC R M, LIU B, et al. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Cell, 2012, 24(11): 4670-4686.